

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik (Vorsteher: Prof. Dr. R. Nissen)
Unter der Leitung von P. D. Dr. M. Allgöwer

Über die unterschiedlichen Entwicklungsfähigkeiten der Zellen des Blutes und der Lymphe in vitro

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Lotte Hulliger

von Basel und Heimiswil (Bern)

1956

Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik (Vorsteher: Prof. Dr. R. Nissen)
Unter der Leitung von P. D. Dr. M. Allgöwer

Über die unterschiedlichen Entwicklungsfähigkeiten der Zellen des Blutes und der Lymphe in vitro

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Lotte Hulliger

von Basel und Heimiswil (Bern)



1956

Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg

Von der Medizinischen Fakultät genehmigt auf Antrag von P. D. Dr. M. Allgöwer

Tag der Promotion: 3. März 1956

Sonderabdruck aus dem Virchow's Archiv Bd. 329, 1956, S. 289

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik Basel (Vorsteher: Prof. Dr. R. NISSEN)

Über die unterschiedlichen Entwicklungsfähigkeiten der Zellen des Blutes und der Lymphe in vitro

Von

LOTTE HULLIGER

Mit 29 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. Mai 1956)

Einleitung

Schädigung vascularisierter Gewebe zieht meist eine entzündliche Reaktion und oft eine bindegewebige Narbenbildung nach sich. Das entzündliche Exsudat enthält neben polynucleären Leukocyten Rundzellen verschiedener Größe und Kernbeschaffenheit. Herkunft und weiteres Schicksal dieser Rundzellen sind bis heute nicht eindeutig geklärt. ALLGÖWER (1956)¹ hat kürzlich die alte MAXIMOWSCHE Auffassung des hämatogenen Ursprungs dieser Rundzellen einer eingehenden experimentellen Prüfung unterzogen. Er gelangte dabei zur Ansicht, daß der überwiegende Teil der Rundzellen im frischen Exsudat hämatogener Natur ist, und daß diese Rundzellen durch intensive mitotische Tätigkeit am Aufbau des jungen Bindegewebes teilnehmen. Seine Ansicht stützt sich auf die folgenden Beobachtungen:

1. Die perivascularäre Rundzelleninfiltration ist vorhanden, bevor sich die lokalen Gewebeelemente zu teilen beginnen.

2. Bei leukopenischen Tieren ist das Granulationsgewebe stark reduziert.

3. Vergleichende Züchtung verschiedener Bindegewebe (subcutanes, intramuskuläres Bindegewebe, kleine epigastrische Gefäße) ergeben in der Kultur konzentrisch wachsende Gewebekulturen. Aus der Leukocytenhaut des Blutes entsteht unter gleichen Bedingungen eine andere Kultur. Lange Zellzüge durchdringen das Plasma. Ausgewanderte Zellen oder Zellgruppen sind imstande, entfernt vom Mutterstück Gewebekolonien zu bilden. Zellzüge, Zellkolonien und isolierte Zellen zeigen zahlreiche Mitosen. Die aus der Leukocytenhaut des Blutes entstehende Gewebekultur läßt eine dem Geschehen in vivo am ehesten vergleichbare Organisation des umgebenden Plasmamaterials zustande kommen.

Der Leukocytenfilm des Blutes besteht aus verschiedenen Zellarten: Granulocyten, Monocyten, Lymphocyten. Die Entscheidung, welche

¹ Für die Anregung zu dieser Arbeit sei Herrn Dr. M. ALLGÖWER, Chirurgische Universitätsklinik Basel, an dieser Stelle bestens gedankt.

der Zellarten verantwortlich ist für die Entstehung des proliferierenden fibrocytären Gewebes *in vitro*, ist nicht möglich.

Die *Granulocyten* machen *in vitro* ausschließlich regressive Veränderungen durch. Ihre Überlebenszeit *in vitro* beträgt nicht mehr als 3—4 Tage (SIERACKI 1955). Von den *Monocyten* wird angenommen, daß sie in Gestalt und Funktion noch wandlungsfähige Zellen sind. Ihre Umwandlungsfähigkeit in Makrophagen, Epitheloidzellige, Histiocyten und Riesenzellen (BLOOM 1928, CARREL und EBELING 1922, 1925, DUNNING und FURTH 1935, EBERT und SANDERS 1939, EHRLICH 1934, FISCHER 1925, DE HAAN 1928/29, LEWIS und LEWIS 1925, MASUGI 1927, MAXIMOW 1928, REBUCK 1940, REEVES 1934, SEEMANN 1930) wird kaum mehr in Frage gestellt. Ihre Umwandlung in Fibrocyten wird von MAXIMOW (1928), BLOOM (1928) und ALLGÖWER (1955) angenommen. Nach EHRLICH (1934) können sich die Vorstufen der Monocyten, nicht aber die reifen Monocyten in Fibrocyten umwandeln.

Die Auffassungen über die Entwicklungsfähigkeit der *Lymphocyten* sind dagegen weniger abgeklärt. Die Unitarier (MAXIMOW 1907, 1928, WEIDENREICH 1909 u. a.) sehen die Lymphocyten als junge, entwicklungsfähige Zellen an, aus denen sich alle anderen Blutzellen bilden können. Von ASCHOFF (1913), MARCHAND (1901) u. a. werden die Lymphocyten andererseits als reife, ausdifferenzierte Elemente angesehen. Die verschiedenen Auffassungen über Entstehung und Schicksal der Lymphocyten werden im folgenden etwas ausführlicher dargestellt:

Die Lymphocyten werden in der Lymphe des Ductus thoracicus und anderer kleinerer Lymphgefäße dauernd ins Blut abgegeben. YOFFEY (1932) und SANDERS (1940) berechneten, daß die Lymphocyten des Blutes 2—2,5mal je Tag ersetzt werden. Trotz dieser enormen Zufuhr von Lymphocyten bleibt die relative und absolute Zahl der Lymphocyten im Blut konstant. Das Schicksal der notwendigerweise aus dem Blut verschwindenden Lymphocyten ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Die Ergebnisse der vielen Arbeiten werden in einer ausgezeichneten Monographie durch YOFFEY (1950) zusammengefaßt und durch eigene Arbeiten ergänzt. Wir versuchen hier die hauptsächlichen Auffassungen kurz zu charakterisieren:

BUNTING und HUSTON (1921) behaupten auf Grund von histologischen Untersuchungen der Darmmucosa, daß die Lymphocyten das Darmepithel durchwandern und im Darmlumen zerstört werden. Diese Lymphocyten bilden einen Teil der natürlichen Abwehrkräfte der Darmwand. Eine Zerstörung der Lymphocyten im Blut oder eine Umwandlung in andere Blutzellen schlossen sie aus, da sich die celluläre Zusammensetzung des Blutes in einem beidseits ligierten Venenstück nach 24 Std nicht veränderte. ERF (1940) zeigte, daß injizierte autologe und heterologe Lymphocyten bei gastroenterektomierten Tieren ebenso rasch aus dem Blut verschwinden wie bei Kontrolltieren. Er folgerte daraus, daß die Lympho-

cyten nicht nur via Darmwand aus dem Blut verschwinden. SJÖVALL (1937) schloß auf Grund von histologischen Untersuchungen des lymphatischen Gewebes auf einen Kreislauf der Lymphocyten vom Blut in die Lymphknoten und via Lymphe und den Ductus thoracicus zurück ins Blut.

MAXIMOW (1907) unterband bei Tieren die A. renalis, in den infolgedessen geschrumpften Nieren beobachtet er eine Umwandlung der Lymphocyten in Erythroblasten, Myeloblasten und Megakaryocyten.

In späteren Untersuchungen an Blutleukocytenkulturen des Meerschweinchens beobachtete er die Entstehung von Fibrocyten und Bindegewebe. Er sieht damit die Beteiligung der hämatogenen Zellen, speziell auch der Lymphocyten, an der Neubildung von Gewebe in entzündlichen Prozessen als bewiesen an.

Vergleichende quantitative Untersuchungen des lymphopoetischen und des erythropoetischen Gewebes (KINDRED 1942) ergaben ein Defizit des erythropoetischen bei einer enormen Überproduktion des lymphopoetischen Apparates. KINDRED sah darin eine Bestätigung der alten Theorie von MAXIMOW (1907) und von JORDAN und SPEIDEL (1923), die behauptet, daß die kleinen Lymphocyten die Funktion von Erythroblasten übernehmen. YOFFEY (1950) nimmt auf Grund von quantitativen histologischen Untersuchungen des Knochenmarks ebenfalls eine Weiterentwicklung der kleinen Lymphocyten an. Auch FARR (1951), der autologe Lymphocyten markiert, sie wieder injiziert und sie zum größten Teil im Knochenmark und zu einem kleineren Teil im lymphatischen Gewebe wieder entdeckt, kommt zu demselben Schluß wie YOFFEY.

Alle diese Auffassungen sind teilweise hypothetisch, sichere Beweise für die Umwandlungspotenzen der Lymphocyten fehlen zur Zeit. Die Frage der Weiterentwicklung der Lymphocyten wurde zwar mit Hilfe von verschiedenen Methoden in vivo und in vitro untersucht. Die meisten Untersucher arbeiteten jedoch mit aus verschiedenen Zellarten zusammengesetztem Ausgangsmaterial (Tabelle 1) wie *Entzündungsgewebe* (BERGEL 1927, KOLOUCH 1939, REBUCK 1947), *Lymphknoten* (BERGEL 1930, BERMAN 1942, DE BRUYN 1948, LATTÄ 1934, SEEMANN 1930, SHIOMI 1925), *Blutleukocyten* (ALLGÖWER 1955, EHRLICH 1934, DE HAAN 1928/29, HALL und FURTH 1938, MAXIMOW 1928, SEEMANN 1930), *vorwiegend lymphocytärem Exsudat* (KREYBERG 1929, REEVES 1934). KOLOUCH und REBUCK untersuchen experimentelle Entzündungsherde in bestimmten zeitlichen Intervallen durch Probeexcisionen. Auf Grund der histologischen Bilder beschreiben sie eine Umwandlung der hämatogenen Entzündungszellen, speziell der Lymphocyten in Makrophagen.

REEVES hat in Untersuchungen von entzündlichem Gewebe keinen Anhaltspunkt für eine Umwandlung der Lymphocyten in Makrophagen gewonnen. In den Kulturen von *Lymphknoten* beschreiben BERGEL, BERMAN, DE BRUYN, LATTÄ während einer Versuchsdauer von maximal 72 Std eine Hypertrophie der kleinen Lymphocyten, anschließend eine Umwandlung in Monocyten, Makrophagen und eventuell Riesenzellen. SHIOMI und SEEMANN hingegen können in zum Teil bis 7 Tage dauernden Versuchen keine progressiven Veränderungen der kleinen Lymphocyten beobachten. In den Kulturen von *Blutleukocyten* beobachtet DE HAAN eine relative Zunahme der Monocyten. Er führt diese Zunahme auf die Hypertrophie von kleinen Lymphocyten zurück. ALLGÖWER, EHRLICH und MAXIMOW beobachten an länger gezüchteten Blutleukocyten gewebartige Verbände von Fibrocyten. MAXIMOW nimmt an, daß diese Fibrocyten sowohl aus Monocyten als auch aus Lymphocyten entstehen. EHRLICH hat keine sicheren Anhaltspunkte für eine Weiterentwicklung der Lymphocyten. ALLGÖWER enthält sich einer Interpretation.

Tabelle 1. *Lymphocyten verschiedenster Herkunft in Gewebekultur*
 Gewebezüchtung von Blutleukocytenfilm, Lymphknoten, entzündlichem Exsudat.

Autor	Material	Dauer	Medium	Resultate
ALLGÖWER 1956	Buffy coat	nach 1 Woche	Carrel natives Plasma ohne Extrakt	Umwandlung in fibrocytär Gewebe
BERGEL 1930	Lymph- knoten	keine Angaben	OT Plasma	Umwandlung der kleinen Ly- phocyten in große und Mo- cyten
BERMAN 1942	Lymph- knoten	nach 50 Std	OT hep. Plasma Embr.extr.	Umwandlung in Polyblaste fibroblastenähnliche Zelle Riesenzellen
DE BRUYN 1948	Lymph- knoten	nach etwa 50 Std	OT gefrorenes Plasma + Milz- extrakt	Umwandlung der Lympho- cyten in Makrophagen (wegungsänderung)
EHRICH 1934	Buffy coat	vom 1. Tag an	OT homologes Serum	nach 1 Tag Auftreten von fik- cytenartigen Zellen, ke- Anhaltspunkte für Umwa- lung der Lymphocyten Polyblasten. Nach 6 Tag gewebeartig
DE HAAN 1928/29	Buffy coat	keine Angaben	Kaninchen- serum Kammer	progressive Umwandlung Lymphocyten in Monocyten Polyblasten (Fibroblasten)
HALL und FURTH 1938	Buffy coat	keine Angaben	Plasma + Embr.extr. OT	nur Monocyten, keine Fik- blasten beobachtet
LATTA 1934	Lymph- knoten	nach 72 Std	OT Plasma + Milzextr.autol Embr.extr.	Umwandlung in Monocyten und Makrophagen
KREYBERG 1929	Tbc Exsudat	nach 24 Std	Kammer (DE HAAN) Serum oder Exsudat	nach 24 Std Umwandlung Lymphocyten in Poly- blasten, Fibroblasten Riesenzellen
MAXIMOW 1928	Buffy coat	nach etwa 6—7 Tagen	Carrel Plasma + Embr.extr. KM.extrakt	Lymphocyten wandeln sich Polyblasten und Fibrocyten um
REEVES 1934	Blut Entzün- dungsgewebe	2 Tage	OT	Umwandlung der Monocyten nicht aber der Lymphocyten in Makrophagen
SEEMANN 1930	Blut Lymph- knoten Lymph	max. 56 Std	OT	echte Lymphocyten, zeigen keine progressive Entw- lung
SHIOMI 1925	Lymph- knoten	bis 7 Tage	OT Serum NN.extrakt Milzextrakt	keine Umwandlung der klei- Lymphocyten beobachtet sterben nach 5—7 Tagen

NN.extrakt: Nebennierenextrakt; KM.extrakt: Knochenmarkextrakt; Embr.extr.:
 Embryonaleextrakt; OT: Objektträgerkulturen; Carrel: Carrel-Flaschenkulturen.

KREYBERG beobachtet in inkubiertem *tuberkulösem Exsudat* eine weitgehende Umwandlung der Lymphocyten in Makrophagen. REEVES kann in ähnlichem Züchtungsmaterial nur eine Umwandlung der Monocyten, nicht aber der Lymphocyten, in Makrophagen beobachten. EBERT (1940) konnte in *Lymphknoten*, die er in durchsichtige Ohrkammern bei Kaninchen einpflanzte, noch nach 7 Tagen lebende Lymphocyten beobachten. Er hatte keine Anhaltspunkte für eine Umwandlung der Lymphocyten in andere Zellformen.

Das Ausgangsmaterial dieser Untersuchungen ist jedoch aus verschiedenen Zellarten zusammengesetzt. Es ist nicht möglich, sicher zu entscheiden, welche Zellarten sich weiterentwickeln.

Eine eindeutige Antwort auf die Frage nach der Entwicklungspotenz der Lymphocyten wäre zu erwarten durch *Untersuchungen mit markierten Lymphocyten in vivo* oder durch *Züchtung von reinen Lymphocyten in vitro*.

Die reinste Suspension von Lymphocyten findet sich in der Lymphe. Die Lymphe des Ductus thoracicus enthält nach den Angaben der meisten Untersucher (Tabelle 2) weniger als 1% Monocyten, die übrigen Zellen sind Lymphocyten verschiedener Größe und Kernbeschaffenheit. Lymphe des Ductus thoracicus wurde bisher von den in Tabelle 3 zusammengefaßten Autoren gezüchtet.

BLOOM (1928) arbeitet im Anschluß an die Züchtung von Blutleukoeyten durch MAXIMOW mit Ductuslymphe. Er beschreibt in seinen Kulturen eine kontinuierliche Umwandlung der kleinen Lymphocyten in große Lymphocyten, in Monocyten und schließlich in Polyblasten und Fibroblasten. In einer späteren Arbeit beobachtet BLOOM (1937) bei der Züchtung der Ductuslymphe von immunisierten Tieren nach Zugabe des Antigens zur Kultur eine Umwandlung der Lymphocyten in Myelocyten und Granulocyten. BLOOM sieht damit die Umwandlungsfähigkeit der Lymphocyten als bewiesen an. HALL und FURTH (1938) und MEDAWAR (1940), die ebenfalls Ductuslymphe züchten, können die Beobachtungen von BLOOM jedoch

Tabelle 2. *Celluläre Zusammensetzung der Lymphe*

Autor	Monocyten	Lymphocyten			Plasma- zellen	Methode
		große	mittlere	kleine		
BLOOM 1937	vereinzelt	20	—	80	—	Supravital Giemsa
BUNTING und HUSTON 1921	keine	20	—	80	—	Supravital Giemsa
HALL und FURTH 1938	0,3	1,1	7,8	90,7	—	Supravital
KINDWALL 1927	0,03	0,8	10,0	88,0	—	Supravital
MEDAWAR 1940	0,6—2,3	6—24	—	63—87	—	Giemsa + Supravital
MURAKAMI 1936	0,7	16	—	83,3	—	Giemsa + Supravital
ROUS 1908	5,6	—	—	94,4	—	—
SANDERS und Mit- arbeiter 1939	1,3	4,3	—	94,4	—	Supravital
THORNE 1922	10	—	—	90	—	Supravital
YOFFEY 1932	—	5	—	95	—	—

Tabelle 3. Züchtung von *Ductuslymphe*

Autor	Lymphgewinnung	Gewebezüchtung	Resultate
BLOOM 1928	Venenwinkel Einschneiden Lymphe läuft aus Aufsaugen	OT und Carrel Plasma mit ver- schiedenen Ex- trakten	Entstehung von ein- zelnen Fibroblasten
HALL und FURTH 1938	Kanüle am Venen- winkel	OT Plasma + Embr.extr.	Kleine Lymphocyten sterben nach 24 Std ab, keine Umwand- lung
MEDAWAR 1940	Kanüle am Venen- winkel	OT Plasma + Embr.extr., Knochenmark- extrakt	Nach 24 Std sind die meisten Lympho- cyten tot
MURAKAMI 1936	Vas efferens der Poplitealdrüse Einschneiden Aufsaugen der Lymphe	OT und Carrel Plasma und ver- schiedene Extrakte	Nach 6—7 Tagen, auch in Carrel- Flaschen, sterben alle Lymphocyten ab. In einer Kultur Auftreten von Fi- broblasten, nicht erklärbar

OT Objektträgerkulturen; Carrel Carrelflaschen

nicht bestätigen. Auch MURAKAMI (1936), der periphere Lymphe züchtet, beobachtet keine progressiven, nur regressive Veränderungen der Lymphocyten.

Es sind somit keine sicheren Beweise für die Weiterentwicklung der Lymphocyten vorhanden.

Im Anschluß an die Züchtung von Blutleukocyten durch ALLGÖWER schien es uns von Interesse zu untersuchen, ob auch die Lymphocyten oder nur die Monocyten für die Bildung des fibrocytären Gewebes in Blutleukocytenkulturen verantwortlich sind. Wir züchteten zur Abklärung dieser Frage Blutleukocyten und Lymphocyten der Ductuslymphe unter gleichen Bedingungen. Diese Untersuchungen werden im folgenden beschrieben.

Material und Technik

1. Gewinnung der Lymphe

Die Lymphe wird durch Kanülierung des Ductus thoracicus gewonnen. Ausgehend von einer von BOLLMAN (1948) beschriebenen Methode wird die Kanüle im abdominalen Teil des Ductus thoracicus eingebunden. Wir operieren junge Kaninchen von 1—2 kg nach 36stündigem Hungern in intravenöser Barbituratnarkose (Nural-Roche). Das Abdomen wird in rechter Seitenlage durch einen Schnitt entlang dem linken Rippenbogen bis gegen den M. quadratus lumborum eröffnet. Die Gedärme werden mit der Leber nach rechts, die linke Niere nach links gelegt und mit Haltern fixiert. Die retroperitoneal liegenden Organe sind sichtbar; die Aorta nach oben von einem Zwerchfellschenkel bedeckt, mit dem

Abgang der A. tricuspidalis, nach links an den Wulst der Rückenmuskulatur grenzend. Mit einer Pinzette eröffnet man das Retroperitoneum in der Rinne links von der Aorta und präpariert die Aorta sorgfältig vom umliegenden Bindegewebe frei. Schließlich löst man das Bindegewebe zwischen Aorta und dem darunter liegenden Ductus thoracicus. Der an der linken Seite der Aorta sichtbare Ductus wird auf eine Länge von etwa 10 mm möglichst freipräpariert. Zwei Fäden werden zuerst unter Ductus und Aorta durchgeführt, die Enden von rechts her zwischen Aorta und Ductus nach links gezogen, so daß der Ductus allein in den beiden Fäden liegt. Der obere Faden wird geknüpft, distal davon eröffnet man den anschwellenden Ductus mit einer scharfen Injektionsnadel und führt einen mit Heparin gefüllten Polyäthylendrain Nr. 90 ein. Sobald die Lymphe einschießt, knüpft man den distalen Faden um den Ductus und den Drain. Der Drain wird mit dem proximalen Faden nochmals fixiert und dann in der Wölbung des Zwerchfells nach ventral und durch die Bauchwand nach außen geführt. Die Laparotomiewunde wird verschlossen. Die Tiere werden während der Versuchsdauer von 6 bis 8 Std in einer leichten Narkose gehalten und bei Beendigung durch Herzpunktion getötet. Die ganze Operation hat unter sterilen Kautelen zu erfolgen. Der Drain wird durch 24stündiges Einlegen in 70% Alkohol sterilisiert und 1 Std vor der Operation mit Heparinlösung gespült und gefüllt. Die Lymphe fließt in sterile, silikonisierte Zentrifugengläschen. Sobald ein Gläschen voll ist, wird es bei 2000 Umdrehungen 3 min lang zentrifugiert. Bis zum Ansetzen der Kulturen nach 1—6 Std läßt man die Gläschen mit der zentrifugierten Lymphe bei Zimmertemperatur stehen. Die Lymphflüssigkeit gerinnt nicht, wenn sie sofort zentrifugiert wird. Ein gerinnungshemmendes Mittel ist überflüssig.

Vorübergehende Sanguinolenz der Lymphe ließ sich aufheben oder verringern durch präoperative und postoperative Injektion von 0,05 g Prostigmin s.c. Es handelte sich histologisch immer um Erythrocyten, Granulocyten waren keine anzutreffen. Wir nehmen an, daß die Sanguinolenz die Folge einer postoperativen Darmatonie ist, die das diapedetische Durchtreten der Erythrocyten in die Lymphbahnen ermöglicht. Nach Prostigmin war meist auch ein besserer Lymphfluß zu beobachten.

Der Lymphfluß wird aufrechterhalten durch dauernde intravenöse Zufuhr des verlorenen Flüssigkeitsvolumens in Form einer Mischung von Ringerlösung und 5%iger Glucose im Verhältnis 1:1.

2. Gewebezüchtung

a) **Leukocytenfilm des Blutes.** Bei der Hälfte der Tiere wurde im Anschluß an die Lymphgewinnung Herzblut gewonnen zur Herstellung eines Leukocytenfilmes nach den Angaben von ALLGÖWER (1956).

b) **Leukocytenfilm der Lymphe.** Der Bodensatz von 20—30 cm³ Lymphe wird in einem Zentrifugenglas angereichert und zentrifugiert. Der angereicherte Bodensatz läßt sich meist ohne Zusatz herausnehmen. Wenn er allzu locker ist, wird natives Kaninchenplasma zugegeben. Hühnerplasma wird bei der Lymphe vermieden, da es sich herausstellte, daß es die Auswanderung der Lymphocyten beeinträchtigt.

c) **Ansetzen des Gewebes.** Die Filme von Blut und Lymphe werden in kleine Stückchen von 1—2 mm Kantenlänge geschnitten, die Stückchen entsprechend der von ALLGÖWER (1956) beschriebenen Methode in nativem, homologem Plasma ohne Zusätze angesetzt.

Carrel-Flaschen. Einerseits werden Leukocytenstückchen von Lymphe allein angesetzt, je 3 Stückchen je Flasche in 1,5 cm³ nativem Plasma. Andererseits werden Leukocytenstückchen von Lymphe und solche von Blut zusammen in derselben Flasche angesetzt als sog. konfrontierte Kulturen.

Rollertubes. Auf speziellen Deckgläschen werden 3 Tropfen natives Plasma ausgebreitet, ohne daß die Tropfen ineinanderfließen. In 2 Tropfen setzt man je 1 Stückchen des Lymphfilmes und in einem Tropfen 1 Stückchen des Blutfilmes an. Die Deckgläschen werden in feuchten Kammern bei Zimmertemperatur stehen gelassen, bis das Plasma geronnen ist. Nachher werden sie in den speziellen Reagensgläsern mit 1,5 cm³ Nährmedium, bestehend aus 50% Kaninchenserum, 50% GEYSCHER Lösung und 1000 E Penicillin je Kubikzentimeter, in den Rotator im Wärmeschrank gebracht.

d) Erneuern der Nährlösung. *Carrel-Flaschen.* Nach 2–3 Tagen wird zum erstenmal die sich bildende, überstehende Flüssigkeit abgesogen und 2–3 Tropfen frisches natives Kaninchenplasma auf die Kultur gebracht. Später werden die Kulturen 2mal je Woche ernährt, die ersten 3–4mal mit Plasma, nachher mit 25%igem Serum, um die Plasmaschicht über den Kulturen nicht weiter zu erhöhen.

Rollertubes. Zweimal je Woche wird ein Drittel der Nährlösung durch neue ersetzt.

e) Organextrakte. Bei einem Teil der Kulturen wurde vergleichsweise Extrakt aus Nebenniere oder aus Milz zugesetzt. Die frischen Organe werden zerkleinert, in der Mörserschale fein zerrieben, mit gleichem Volumen GEYSCHER Lösung aufgeschwemmt und anschließend zentrifugiert.

Tabelle 4

Total der Versuche	18
Mittlerer Lymphfluß während der Versuchsdauer von 6–8 Std	5,2 cm ³ /kg/Std, mit Extremwerten von 3,1–7,4 cm ³ /kg/Std
Leukocytenfilm von Lymphe	
Total der Kulturen	360
In Carrel-Flaschen	235
In Rollertubes	125
Leukocytenfilm vom Blut des gleichen Tieres bei 10 Tieren	10
Total der Kulturen	190
In Carrel-Flaschen	65
In Rollertubes	125

Differentialbilder der Ausstriche von Blut (Durchschnitt von 200 Zellen je Versuch)

Nr.	Lymphocyten			Monocyten	Zwischenformen	Granuloeyten
	klein	mittel	groß			
8	2,0	9,0	—	10,0	9,0	70,0
9	nicht zählbar					
10	35,0	13,0	1,0	7,0	4,0	40,0
11	6,5	19,0	6,5	3,0	2,0	63,0
12	—	8,0	0,5	7,0	5,0	78,5
13		13,0	3,0	1,0	—	83,0
14		4,0	1,0	11,0	5,0	79,0
15		6,0	2,0	—	4,0	88,0
16	2,5	13,5	1,0	6,5	6,5	70,0
17	35,0	9,5	1,5	4,0	2,0	48,0
18	2,5	42,5	—	10,5	4,5	40,0
Mittel	8,4	13,8	1,6	6,0	4,2	66,0

Bei anderen Kulturen wurde ein Extrakt aus Leukocyten zugegeben. Die Leukocyten von 30—40 cm³ Blut werden in einem Erlenmeyer-Kolben mit GEYSER Lösung aufgeschwemmt und mit feinen Glasperlen 30 min lang rotiert. Die Lösung wird zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit abgesogen und zu den Kulturen gegeben.

3. Cytologische Untersuchungen von Blut und Lymphe

Während der Lymphgewinnung bestimmen wir periodisch die Zellzahl der Lymphe und fertigen Ausstriche für die cytologische Untersuchung an. Ebenso wird in größeren zeitlichen Abständen das Blut der Tiere cytologisch untersucht. Die Ausstriche werden nach PAPPENHEIM gefärbt. Vergleichsweise färbten wir Ausstriche nach der Methode von SEEMANN mit Neutralrot.

Da es am Rande der Ausstriche zu einer Häufung von Monocyten und großen Lymphocyten kommt, zählten wir immer eine halbe Objektträgerbreite aus, um eine richtige prozentuale Verteilung zu erhalten. Je Ausstrich zählten wir mindestens 200 Zellen aus. Die mittlere Verteilung der Lymphzellen eines Tieres berechneten wir aus 100 ausgezählten Zellen. Die prozentuale Zusammensetzung der verschiedenen Zellarten veränderte sich in der gesammelten Lymphe während der Versuchsdauer von 6—8 Std nicht in auffallender Weise. Wir geben deshalb in Tabelle 4 und 5 nur die mittlere Verteilung der Zellarten je Versuch an.

4. Histologische Untersuchung der Kulturen

Die Rollertubes-Kulturen werden in toto auf dem Deckglas fixiert und mit Hämalaun Mayer oder nach PAPPENHEIM gefärbt. Das Ausgangsmaterial wurde zu Vergleichszwecken ebenfalls in einem Tropfen Plasma angesetzt, sofort fixiert und auf die gleiche Weise behandelt wie die inkubierten Kulturen. Wir fixierten täglich 2 Deckgläschen mit je 3 Kulturen.

Tabelle 5. Differentialbilder der Ausstriche von Lymphe
(Durchschnitt von 1000 Zellen je Versuch.)

Nr.	Lymphocyten			Monocyten	Zwischen- formen
	klein	mittel	groß		
1	98,8	1,0	0,2	—	—
2	65,9	28,3	4,0	—	1,8
3	89,1	6,5	1,1	0,8	2,5
4	79,1	15,6	3,1	0,1	2,1
5	83,2	12,5	1,3	0,3	2,7
6	91,6	7,1	1,1	—	0,2
7	91,5	7,9	0,1	—	0,5
8	68,0	26,3	2,5	0,4	2,8
9	85,4	12,2	1,1	0,2	1,1
10	91,8	7,0	1,5	—	0,7
11	81,5	15,9	1,6	0,1	1,1
12	77,4	15,0	7,7	0,5	0,4
13	57,7	33,9	7,8	0,3	0,3
14	28,4	64,8	3,7	0,1	3,0
15	62,5	35,7	1,6	—	0,2
16	55,5	37,1	5,5	0,2	1,7
17	71,3	26,5	1,7	0,3	0,2
18	83,8	13,8	2,6	—	0,3
Mittel	76,2	19,7	2,7	0,2	1,2
Mittel nach Supravitalfärbung	95,9	—	2,8	0,2	1,1

5. Photographische Dokumentierung

Die Kulturen in Carrel-Flaschen wurden alle 2—3 Tage unter dem Mikroskop angesehen und interessante Befunde photographisch festgehalten.

Die Photographien der lebenden Kulturen wurden mitm. axial 50facher Vergrößerung gemacht.

Die fixierten Roller-tubes Kulturen dienen dem näheren histologischen Studium und dessen photographischer Dokumentierung. Die Übersichtsphotos wurden mit 50facher, die Detailaufnahmen mit Ölimmersion mit 300facher Vergrößerung gemacht.

Ergebnisse

Die Zahlen der Versuche und der Kulturen sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

1. Celluläre Zusammensetzung von Blut und Lymphe

Die Zellzahlen von Blut und Lymphe sind in Tabelle 4 und 5 zusammengestellt.

In den nach PAPPENHEIM und mit Neutralrot gefärbten Ausstrichen von Blut und Lymphe des Kaninchens unterschieden wir folgende mononucleäre Zellarten:

a) **Kleine Lymphocyten.** Zellen, die maximal Erythrocytengröße erreichen, einen kleinen Protoplasmasaum erkennen lassen, bei mittlerer Färbedauer dunkelblau pyknotische Kernstrukturen haben und erst bei schwächerer Färbedauer

Abb. 1. Lymphe, kleine Lymphocyten,
1 Erythrocyt. Vergr. 1000mal

Abb. 2. Lymphe, mittlere Lymphocyten,
1 Wanderform. Vergr. 1000mal

Abb. 3. Lymphe, 2 große Lymphocyten.
Vergr. 1000mal

Abb. 4. Lymphe, 1 Monocyt, 2 kleine
Lymphocyten. Vergr. 1000mal

Abb. 5. Lymphe, 1 Zwischenform, 1 kleiner
Lymphocyt. Vergr. 1000mal

Abb. 1

Abb. 2

Abb. 3

Abb. 4

Abb. 5

eine grobschollige Chromatinstruktur zeigen (Abb. 1). Mitosen der kleinen Lymphocyten wurden keine beobachtet.

b) **Mittlere Lymphocyten** sind größer als Erythrocyten, erreichen jedoch den doppelten Erythrocytendurchmesser nicht. Sie haben wenig Protoplasma, der Kern läßt ein grobscholliges Chromatingerüst erkennen, das manchmal radspeichenartige Strukturen zeigt. Typische Plasmazellen wurden keine beobachtet. In Abb. 2 ist ein mittlerer Lymphocyt in der langgezogenen Wanderform, der sog. „hand-mirror“ Form (DE BRUYN 1948) zu sehen.

Vereinzelte mittlere Lymphocyten wurden in Ana- oder Telophase beobachtet.

c) **Große Lymphocyten** sind größer als 2 Erythrocytendurchmesser, haben ein intensiv dunkelblaufärbtes Protoplasma, einen dunkelroten Kern mit grobem Chromatingerüst. Der Kern ist meist rund (Abb. 3), kann jedoch leichte Einbuchtungen haben. Vereinzelte Mitosen von großen Lymphocyten wurden beobachtet.

d) **Monocyten** sind meist größer als die großen Lymphocyten. Der Kern ist rund oder nierenförmig eingebuchtet. Er ist zart blaufärbt und reticulär strukturiert. Das Protoplasma ist blaugrau oder sehr hell und enthält oft Vacuolen (Abb. 4).

e) **Zwischenformen von Monocyten und Lymphocyten.** Diese Gruppe wurde gebildet, weil sich einzelne Zellen weder in die Gruppe der Monocyten noch in diejenige der großen Lymphocyten einteilen ließen, sondern Charakteristika beider Zellgruppen aufwiesen, sowohl bei der Färbung nach PAPPENHEIM als auch bei der Supravitalfärbung. Diese Zellen haben die Größe der großen Lymphocyten. Der Kern ist feiner strukturiert als bei den großen Lymphocyten, er hat aber nie das zarte Reticulumgerüst der Monocyten. Das Protoplasma ist dunkler blau (Abb. 5).

2. Beobachtungen an lebenden Kulturen in Carrel-Flaschen und an fixierten Kulturen aus Rollertubes

Zwischen den Kulturen von Lymphleukocyten, die allein gezüchtet wurden, und solchen, die zusammen mit Blutleukocyten gezüchtet wurden, konnte kein Unterschied festgestellt werden. Die folgenden Beobachtungen wurden bei beiden Züchtungsarten gemacht.

1./2. Tag. *Blutleukocytenfilm.* Die Auswanderung der Zellen aus dem Mutterstück ist nach 24 Std beendet (Abb. 6). Man erkennt verschiedene Zellformen und -größen (Abb. 7). Nach 24 Std finden sich zwischen degenerierenden Granulocyten und unveränderten Lymphocyten deutlich vergrößerte Zellen mit lockerem Chromatingerüst und viel Protoplasma mit Pseudopodienbildung (Abb. 8). Man könnte diese

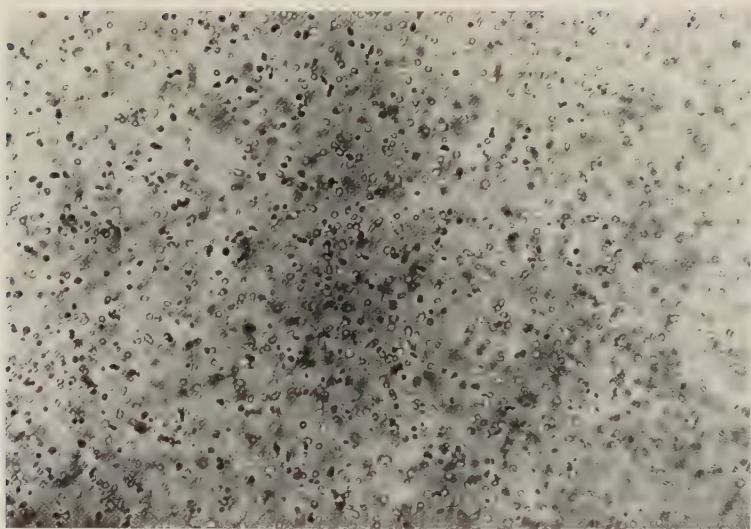


Abb. 6. Blut, Auswanderungszone nach 36 Std. Lebende Kultur. Vergr. 50mal

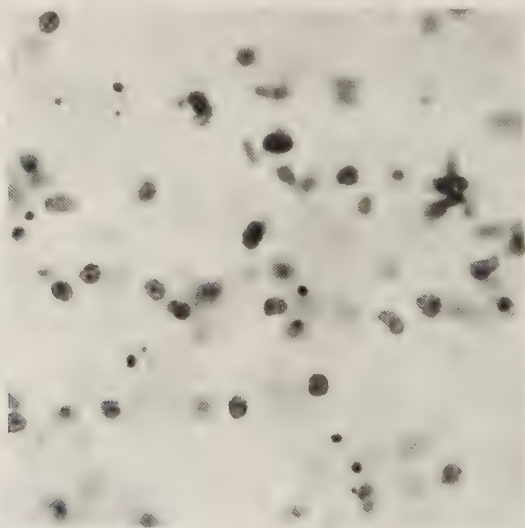


Abb. 7. Blut, Auswanderungszone, einzelne Zellen, 24 Std alte fixierte Kultur. Vergr. 300mal

Zellen in Anlehnung an die Nomenklatur von MAXIMOW „Polyblasten“ nennen.

Lymphleukocytenfilm. Die Auswanderung der Lymphocyten aus dem Mutterstück geht über 48—72 Std vor sich (Abb. 9). Die Zellen sind in der gleichen Größenordnung (Abb. 10) wie die Zellen in gleich-

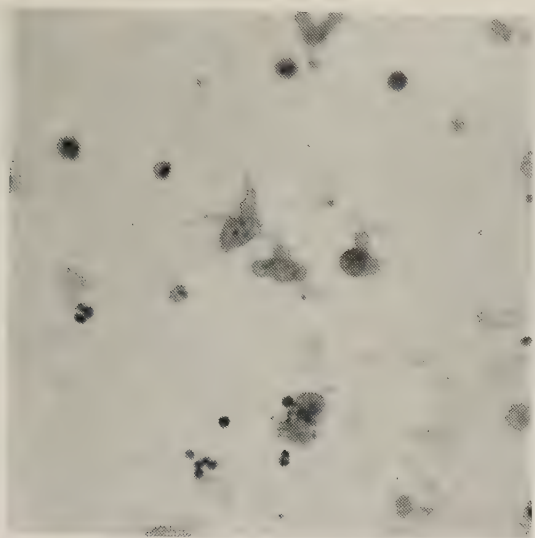


Abb. 8. Blut, Auswanderungszone, „Polyblasten“. 48 Std alte fixierte Kultur. Vergr. 300mal

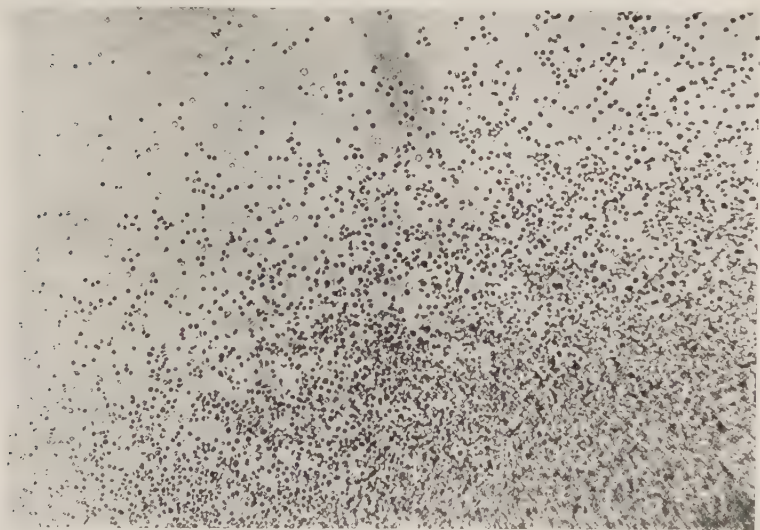


Abb. 9. Lymphe, Auswanderungszone, 36 Std alte lebende Kultur. Vergr. 50mal

alten Blutkulturen (Abb. 7). Die Lymphocyten (Abb. 10) haben sich wenig, aber immerhin deutlich vergrößert gegenüber dem Ausgangszustand (Abb. 11) zu Beginn der Züchtung. Ganz vereinzelt findet man ausgesprochen vergrößerte Zellen mit lockerem Chromatingerüst von der Art der „Polyblasten“ in den Blutkulturen.



Abb. 10. Lymphe, Auswanderungszone, einzelne Lymphocyten, 24 Std alte fixierte Kultur.
Vergr. 300mal

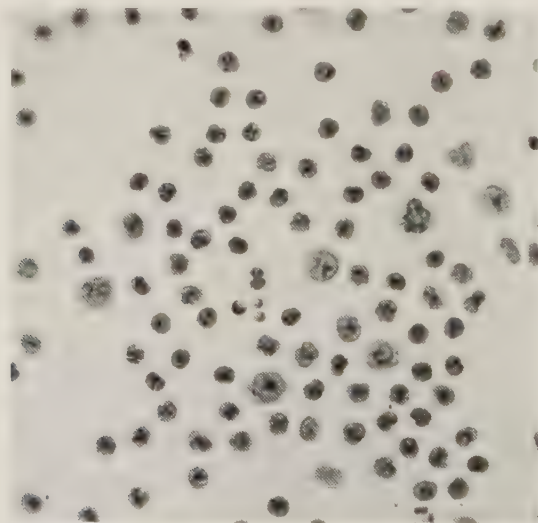


Abb. 11. Lymphe, kleine und große Lymphocyten, fixiert unmittelbar nach dem Ansetzen.
Vergr. 300mal

3./4. Tag. *Blutleukocytenfilm*. Die Zelldichte in der Auswanderungszone hat abgenommen (Abb. 12), die Granulocyten sind verschwunden. Die großen protoplasmareichen Zellen haben sich um ein Mehrfaches ihres Ausgangsvolumens vergrößert (Abb. 13). An vielen Stellen sind daneben unveränderte Lymphocyten zu beobachten. Übergangsformen

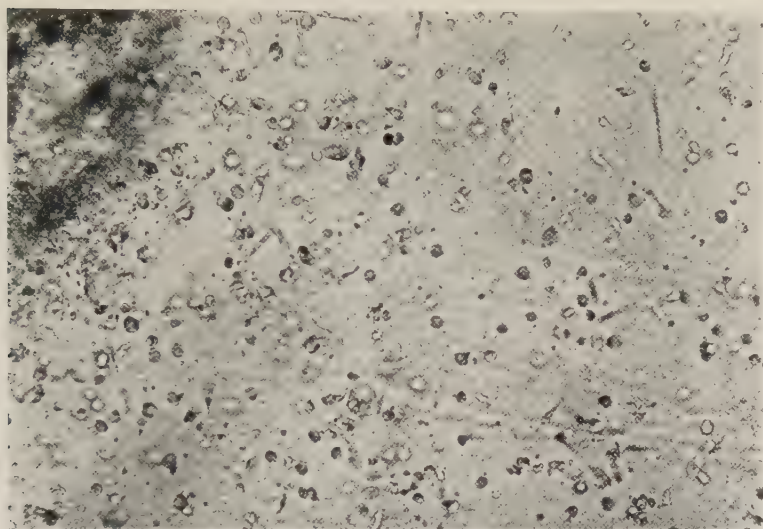


Abb. 12. Blut, Auswanderungszone, 4 Tage alte lebende Kultur. Vergr. 50mal

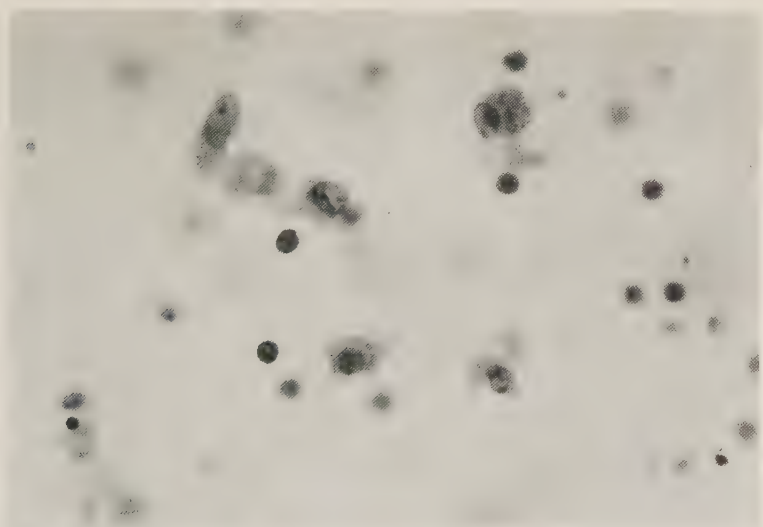


Abb. 13. Blut, Auswanderungszone, einzelne „Polyblasten“. 3 Tage alte fixierte Kultur. Vergr. 300mal

zwischen den Lymphocyten und den großen protoplasma reichen Zellen haben wir keine beobachtet. An einzelnen Stellen, meist am Rande des Mutterstückes (Abb. 14) oder im Bereich von Verflüssigungszonen häufen sich die großen runden Stellen. An verschiedenen Stellen nehmen sie spindelige Form an (Abb. 15).

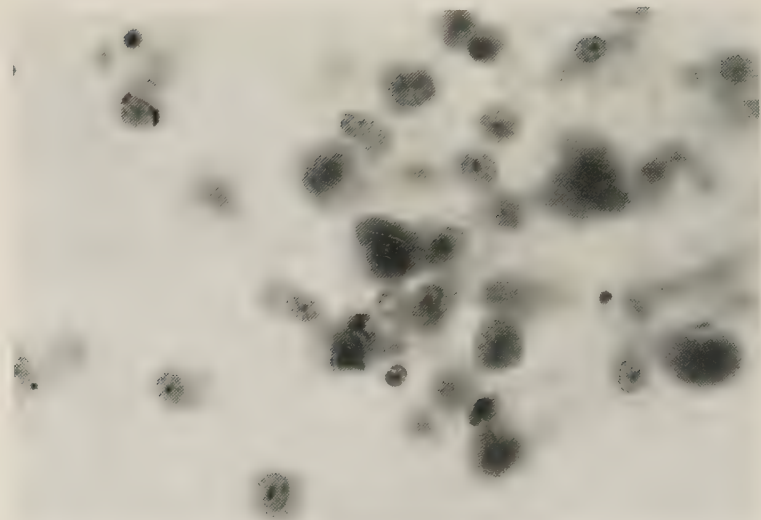


Abb. 14. Blut, Rand des Mutterstückes, 4 Tage alte fixierte Kultur. Vergr. 300mal

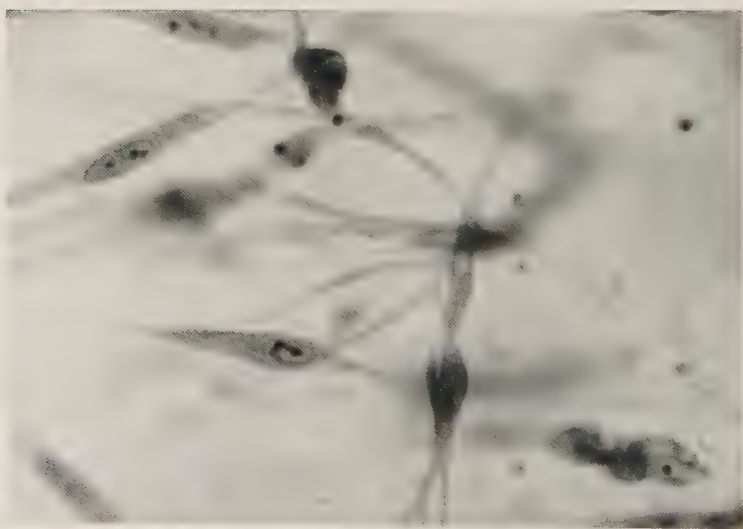


Abb. 15. Blut, einzelne spindelförmige Zellen. 4 Tage alte fixierte Kultur. Vergr. 300mal

Lymphlenkocytenfilm. Die meisten Zellen sind gleichmäßig rund und unverändert klein. Neben den unveränderten Lymphocyten mit klaren Kernstrukturen sind immer mehr degenerierende Zellen zu beobachten (Abb. 16). Daneben haben sich einzelne Zellen ganz enorm vergrößert (Abb. 17). Meist sind diese Zellen abgerundet und gefüllt

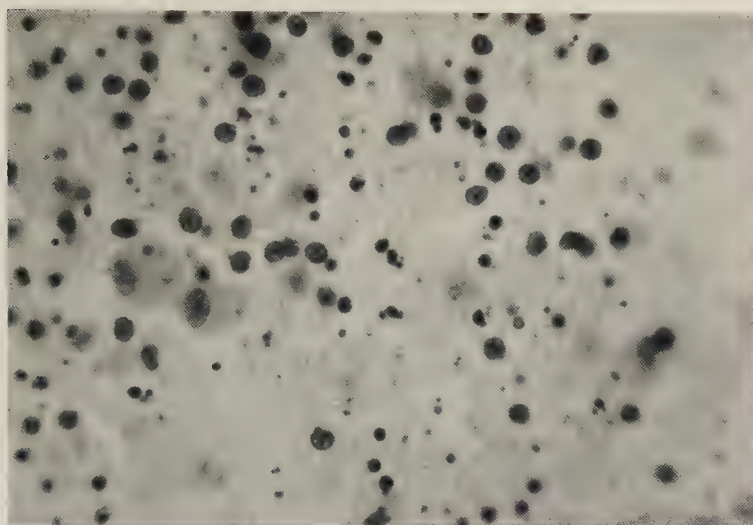


Abb. 16. Lymphe, degenerierende Lymphocyten, 4 Tage alte fixierte Kultur. Vergr. 300mal

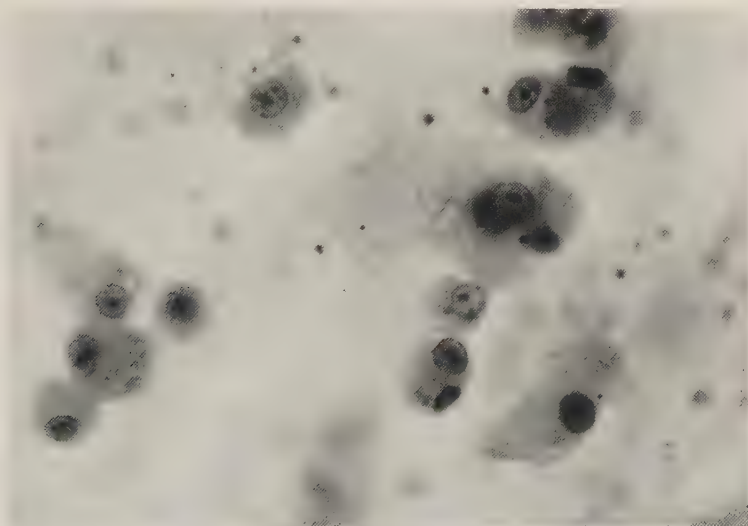


Abb. 17. Lymphe, einzelne Makrophagen, 4 Tage alte fixierte Kultur. Vergr. 300mal

mit phagocytiertem Material; manchmal, vor allem in Kulturen, die viele große Zellen enthalten, sind sie aber auch spindelförmig (Abb. 18), ähnlich wie in Blutkulturen.

5. Tag und später. *Blut-Leukocytenfilm*. An verschiedenen Stellen der Kulturen, am Rande des Mutterstückes (Abb. 19) oder auch in

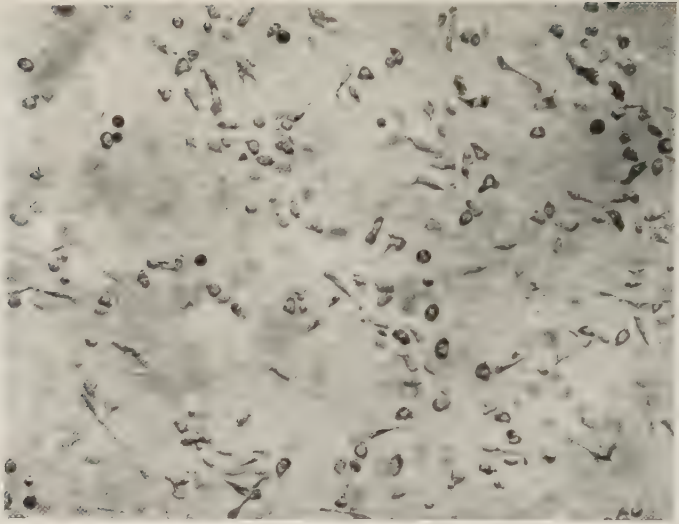


Abb. 18. Lymphe, Verflüssigungszone, 4 Tage alte lebende Kultur. Vergr. 50mal

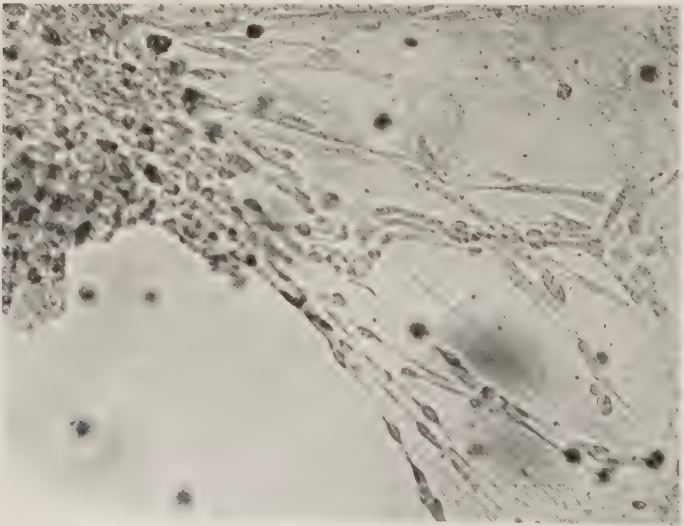


Abb. 19. Blut, Rand des Mutterstückes, 8 Tage alte lebende Kultur. Vergr. 50mal

der Auswanderungszone wachsen fibrocytäre Zellen aus. Zahlreiche Mitosen (Abb. 20) sind im Bereich der Fibrocyten sprossungen zu beobachten. Die lebhaft wachsenden Fibrocyten bilden einen gewebeartigen Verband und organisieren das umgebende Plasmamedium



Abb. 20. Blut, fibrocytärer Zellsproß, 8 Tage alte fixierte Kultur. Mitosen. Vergr. 300mal

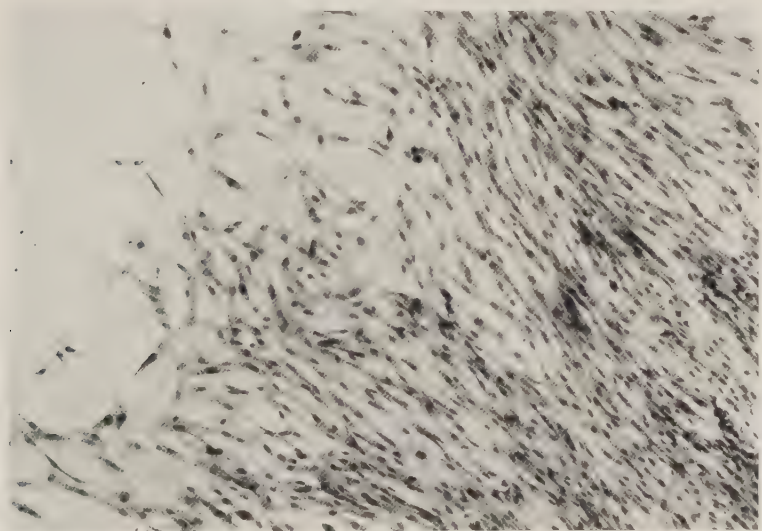


Abb. 21. Blut, fibrocytäres Gewebe, 14 Tage alte fixierte Kultur. Vergr. 50mal

(Abb. 21). Die einzelnen Zellen können verschiedene Formen annehmen, teils mehr epitheloide (Abb. 22), teils mehr spindelige (Abb. 23). Die kontinuierliche Züchtung solcher Kulturen in Passagen scheint keine Schwierigkeiten zu bieten (Abb. 24). In den wenigen Kulturen, in

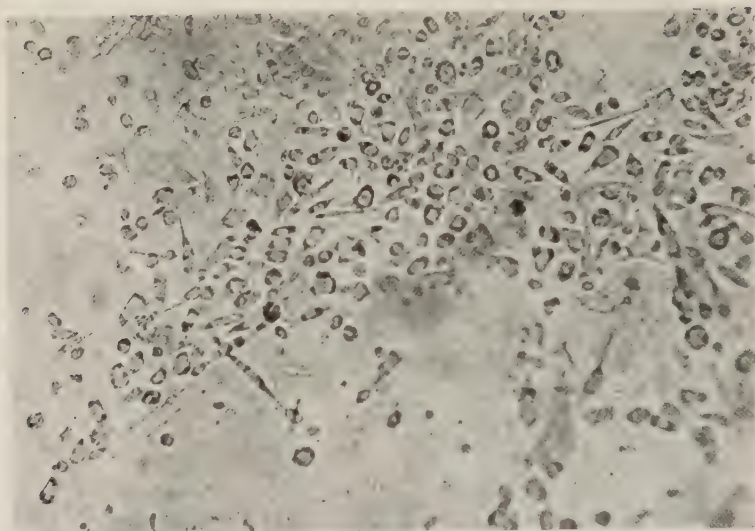


Abb. 22. Blut, epitheloide Zellformen, 17 Tage alte lebende Kultur. Vergr. 50mal

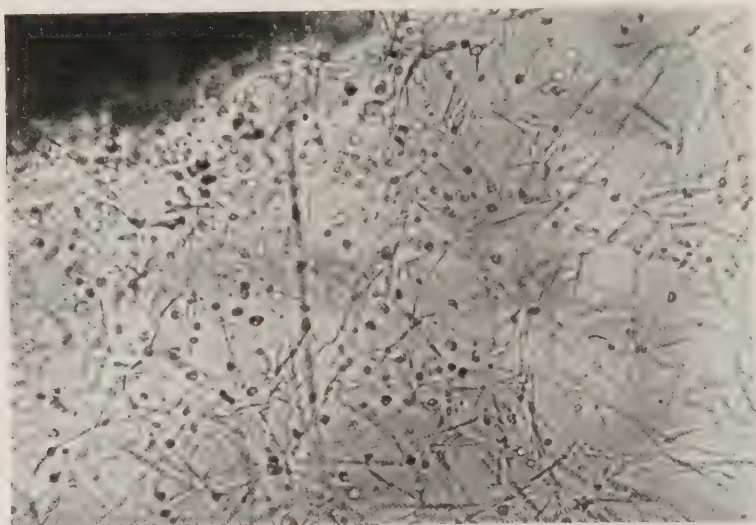


Abb. 23. Blut, spindelige Zellformen, 25 Tage alte lebende Kultur. Vergr. 50mal

denen es nicht zur Proliferation von Fibrocyten kommt (Abb. 25), sind ähnliche Makrophagen und Riesenzellen zu beobachten wie in Kulturen von Lymphe (Abb. 26).

Lymphleukocytenfilm. Die kleinen Zellformen degenerieren zunehmend, sie werden pyknotisch, verlieren die Kernstruktur und zer-

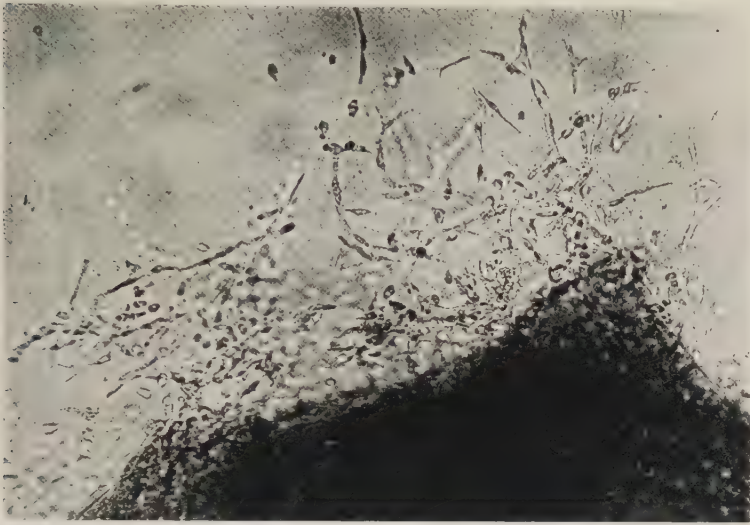


Abb. 24. Blut, 24 Std nach dem Umsetzen der Kultur, 23 Tage alte lebende Kultur. Vergr. 50mal

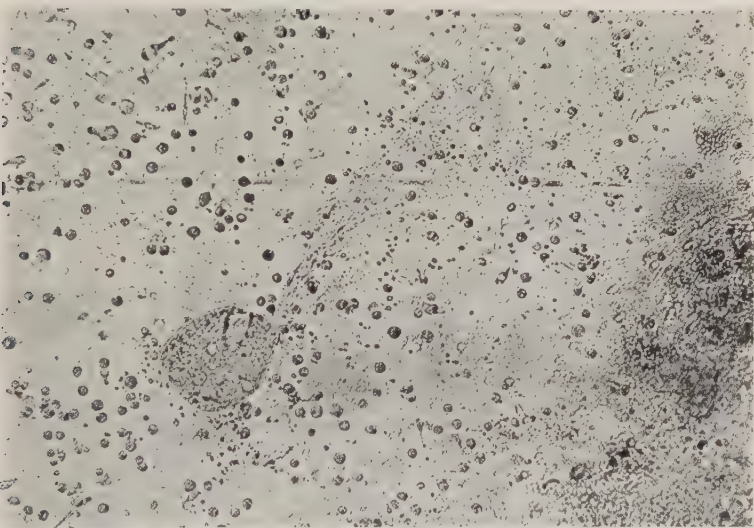


Abb. 25. Blut, Makrophagen und Riesenzelle, 9 Tage alte lebende Kultur. Vergr. 50mal

fallen. Zwischen den zahlreichen Zelleichen vergrößern sich einzelne Zellen immer mehr bis zur Bildung von mehrkernigen Riesenzellen (Abb. 27). Um die großen Phagocyten herum kann man einen Hof beobachten, der von toten Zellen ganz gesäubert ist (Abb. 28).

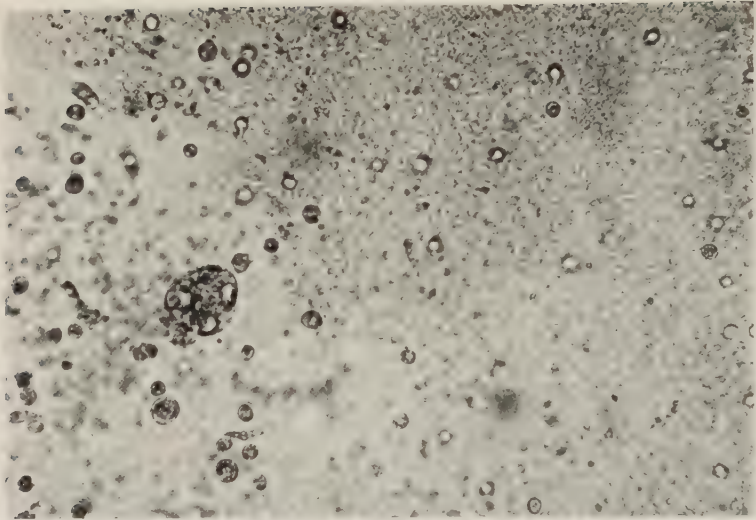


Abb. 26. Lymphe, Makrophagen und Riesenzelle, 9 Tage alte lebende Kultur. Vergr. 50mal



Abb. 27. Lymphe, Riesenzelle, 8 Tage alte fixierte Kultur. Vergr. 300mal

An einzelnen Stellen, speziell am Rande von Verflüssigungszonen mit typischen Plasmastrukturen, können einzelne Zellen spindelförmige Gestalt annehmen (Abb. 29). In einzelnen Versuchen (Tabelle 5, Versuch 15) sind diese Zellen häufiger, in anderen seltener. Im allgemeinen sind die spindelförmigen Zellen in den Lymphkulturen viel seltener als in

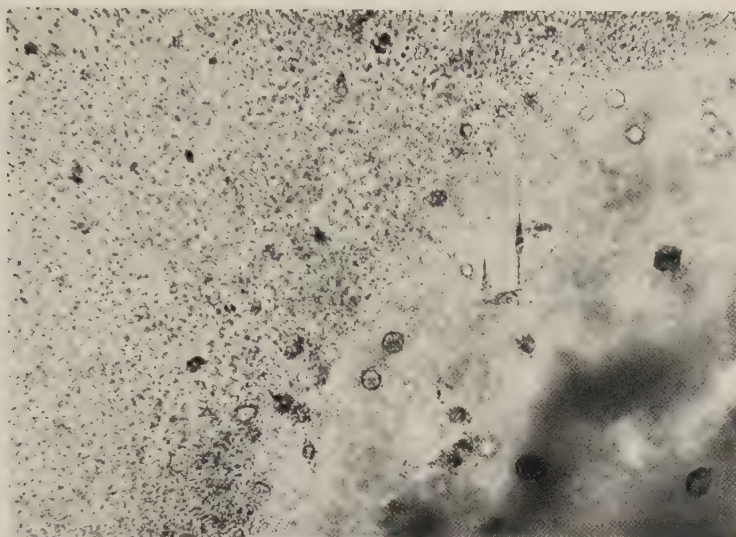


Abb. 28. Lymphe, Makrophagen räumen unter den toten Lymphocyten auf. 7 Tage alte lebende Kultur. Vergr. 50mal



Abb. 29. Lymphe, einzelne fibroblastenähnliche Zellen. 20 Tage alte fixierte Kultur. Vergr. 300mal

den Blutkulturen. In 2 von total 360 Lymphkulturen konnten wir Mitosen der spindelförmigen Zellen und Bildung eines proliferierenden fibrocytären Gewebes beobachten.

Diskussion

1. Züchtungsmaterial

Wir untersuchten die Entwicklungsfähigkeiten der Lymphocyten in vitro durch Züchtung von Lymphe des Ductus thoracicus, die fast ausschließlich Lymphocyten enthält.

Nach unseren Untersuchungen finden sich in der *Ductuslymphe* 96% kleine und mittlere Lymphocyten, die übrigen 4% entsprechen größeren Zellformen, die nicht einfach zu klassifizieren sind. Von diesen sind 2,7% große Lymphocyten, 0,2% Monocyten, die übrigen 1,2% lassen sich nicht eindeutig zur einen oder anderen Gruppe zählen, wir bezeichneten sie als Zwischenformen. Einzelne mittlere und große Lymphocyten weisen morphologische Ähnlichkeiten mit Plasmazellen auf (Radspeichenstruktur des Kernes). Eindeutige Plasmazellen konnten jedoch nicht festgestellt werden. Wir verzichteten deshalb auf eine weitere Klassifizierung, da sie für unsere Fragestellung nicht von Belang war. Die Gruppe der Zwischenformen ist nicht neu. SEEMANN (1930) hat diese Zellformen „monozytoide Zellen“ genannt und damit zum Ausdruck gebracht, daß er sie zum monocytären System rechnet, das er vom lymphocytären System trennt. Im Gegensatz dazu nannte MAXIMOW (1928) diese Zellformen „Übergangsformen“ und sah in ihnen einen wichtigen Beweis für die Theorie der Umwandlung von Lymphocyten in Monocyten.

Die in Tabelle 2 zusammengestellten Zahlen der prozentualen cellulären Zusammensetzung der Ductuslymphe sind unterschiedlich. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich auf verschiedene Einteilungen zurückzuführen. Diejenigen Untersucher, die über 1% Monocyten angeben, haben anscheinend die Zwischenformen zu den Monocyten gezählt. Wenn ROUS (1908) und THORNE (1922) sogar 5,6 und 10% Monocyten angeben, so sind darin wahrscheinlich die Zwischenformen und die großen Lymphocyten einbegriffen. BLOOM hingegen gibt nur vereinzelte Monocyten an, er zählt die Zwischenformen anscheinend zu den großen Lymphocyten, die bei ihm 20% ausmachen. Sein Ausgangsmaterial scheint sehr reich an Zwischenformen und großen Monocyten zu sein, eventuell infolge der experimentellen Peritonitis bei seinen Tieren.

Morphologische Kriterien sind anscheinend nicht genügend für die Differenzierung der verschiedenen monocytären Formen des Blutes und der Lymphe. Sie haben auch bisher keine endgültigen Erkenntnisse über Genese und Weiterentwicklung dieser Zellen gebracht. Wir maßen deshalb funktionellen Kriterien wie Wanderungsart, Wachstum und Formveränderungen mehr Bedeutung bei.

Blut und Lymphe enthalten, abgesehen von den Granulocyten, gleiche Zellen, aber in verschiedenen Anteilen. Der Blutleukocytenfilm

besteht in unseren Versuchen aus 12% großen mononucleären Formen, 22% kleinen und mittleren Lymphocyten und 66% Granulocyten. Der Lymphleukocytenfilm enthält 96% kleine und mittlere Lymphocyten, 4% große mononucleäre Formen und keine Granulocyten. Die vergleichende Züchtung dieser beiden Filme ergab verschiedene Resultate.

2. Züchtungsergebnisse

In den *Kulturen von Blut* vergrößern sich viele Zellen in den ersten 2—3 Tagen um ein Mehrfaches ihres Ausgangsvolumens, sie nehmen spindelige Form an. Die großen Zellen bilden ein Netz von spindeligen Stellen. Zwischen dem 5. und dem 8. Tag treten an verschiedenen Stellen gleichzeitig Mitosen auf. Es bildet sich ein lebhaft wachsendes fibrocytäres Gewebe.

In den *Kulturen von Lymphe* erkennt man in den ersten 24 Std eine Auflockerung der Kernstruktur und eine kleine Volumenvergrößerung bei den meisten Zellen. In den folgenden Tagen vergrößern sich diese Zellen nicht weiter, sie gehen nach 4—7 Tagen durch Pyknose oder Karyolyse zugrunde. Eine kleine Zahl von Zellen vergrößert sich zunehmend. Diese Zellen phagocytieren tote Zellen aus ihrer Umgebung und werden dabei zu dunkel granulierten Makrophagen und Riesenzellen; vereinzelte Zellen nehmen auch spindelige Form an. Mit Ausnahme von zwei von total 360 Kulturen (einer Rollertube- und einer Carrel-Flaschenkultur), kam es jedoch nicht zur Proliferation von Fibrocyten und zur Gewebebildung. In den 2 Kulturen beobachtete man ein fibrocytäres Gewebe, das von gleichalten Blutleukocytenkulturen nicht zu unterscheiden ist. In zwei weiteren Kulturen finden sich Ansätze zur Gewebebildung, ohne daß Mitosen zu beobachten sind. Diese Unterschiede wurden, abgesehen von den beschriebenen Ausnahmen, in allen Kulturen, in den reinen Lymphkulturen wie in den mit Blutkulturen konfrontierten, in den Carrel-Flaschen wie in den Rollertubes beobachtet.

Wie ist dieses verschiedene Verhalten der beiden Leukocytenfilme zu erklären? Ist der Grund in verschiedenen Züchtungsbedingungen oder in verschiedener Zusammensetzung der beiden Filme zu suchen?

Konfrontierte Kulturen in Carrel-Flaschen und in Rollertubes stehen unter *identischen Züchtungsbedingungen*. ALLGÖWER (1956) beobachtete eine Weiterentwicklung der Blutleukocyten in Fibrocyten in Kulturen, die er in nativem Plasma ohne Organextrakte züchtete. Wir nahmen deshalb an, daß dieses Medium auch für die vergleichsweise Züchtung von Lymphe genügen und eine gleiche Entwicklung der Lymphzellen ermöglichen würde. Frühere Untersucher züchteten Lymphocyten unter Zugabe verschiedener Organextrakte wie Milzextrakt (BLOOM, DE BRUYN, LATTA, MURAKAMI), Nebennierenextrakt (SHIOMI), Knochenmarkextrakt

(BLOOM, MAXIMOW, MURAKAMI). Sie beschreiben eine Verlängerung der Überlebenszeit der Lymphocyten in vitro unter der Wirkung dieser Extrakte. Unsere vergleichsweise mit Zusatz von Organextrakten gezüchteten Lymphkulturen unterschieden sich jedoch nicht von solchen, die ohne Zusätze gezüchtet wurden.

Das verschiedene Verhalten der beiden Filme kann demnach nicht mit verschiedenen *äußeren Züchtungsbedingungen* erklärt werden. Verschiedene „innere“ Bedingungen könnten in den beiden Filmen dadurch entstehen, daß in den Kulturen des Blutfilmes die Granulocyten früh zugrunde gehen und als Fermentspender wirken. Die Lymphkulturen enthalten keine solchen Fermentspender. Diese Wirkung scheint jedoch für die Lymphkulturen nicht von Bedeutung zu sein, da weder in den mit Blutleukocyten konfrontierten Kulturen noch nach Zusatz eines Leukocytenextraktes eine Veränderung im kulturellen Verhalten der Lymphkulturen festzustellen ist.

Man könnte sich vorstellen, daß ein lokal umschriebener Verflüssigungsprozeß, wie ihn MÜHLETHALER (1952) als Ursache der Entstehung von Makrophagen annimmt, von Bedeutung wäre. Wir beobachteten aber in vielen Kulturen von Lymphe lokale Verflüssigungszonen, ohne daß es zu einer Wirkung auf das Verhalten der Zellen kam. In Kulturen von Blutleukocyten fanden sich die fibrocytären Sprossungen auffallend häufig im Bereich von lokalen Verflüssigungszonen.

Was die *quantitative Zusammensetzung der beiden Filme* anbetrifft, so ist die Zellzahl in einem angesetzten Stückchen von 1 mm Kantenlänge in den beiden Filmen größtmäßig etwa gleich, beide Filme werden aus 30—40 cm³ Blut bzw. Lymphe gebildet, die 8000—10000 bzw. 6000 bis 14000 Zellen enthält. Dagegen ist die prozentuale Zellzusammensetzung der beiden Filme verschieden. Die Lymphleukocytenstückchen enthalten etwa 3mal weniger große mononucleäre Zellen als die Blutleukocytenstückchen. Diese großen mononucleären Zellen erweisen sich als sehr aktive Phagocyten. In den Lymphkulturen haben sie große Mengen an toten Lymphocyten zu bewältigen. Sie vergrößern sich zunehmend durch das phagocytierte Material. In den Blutleukocytenkulturen sind die phagocytierenden Zellen 3mal häufiger, gleichzeitig ist das zu phagocytierende tote Zellmaterial kleiner, da sich die Granulocyten auflösen und weniger für die Phagocytose in Frage kommen als die kleinen Lymphocyten. Die großen mononucleären Zellen entwickeln sich dementsprechend in den Blutleukocytenkulturen weniger zu ausgesprochenen Phagocyten, sie bilden vielmehr Netze von spindeligen Zellen. In diesem Zusammenhang ist das Verhalten einiger Lymphfilme, die relativ viel große Zellen enthielten, von Interesse (Tabelle 5, Versuch 8, 12, 13, 14, 16). In den Kulturen dieser Filme kam es zu einer außerordentlichen Häufung von spindeligen Zellen und von Makrophagen. In zwei von den

total 360 Kulturen kam es sogar zur Ausbildung eines proliferierenden fibrocytären Gewebes. Umgekehrt beobachteten wir in Blutleukocytenkulturen, die zu Beginn nur wenig große mononucleäre Zellen enthielten, wenige, aber enorm vergrößerte Makrophagen, zum Teil eigentliche Riesenzellen, ohne daß es zur Proliferation von spindeligen Zellen kam.

Es scheint uns, daß die großen mononucleären Zellen in Blut und Lymph ähnliche Entwicklungsfähigkeiten in Richtung Fibrocyten oder Makrophagen haben. Die Richtung, in der sie sich entwickeln, scheint unter anderem durch die Menge des phagocytierten Materials bestimmt zu werden. Wenn die Zellen eine gewisse Menge an totem Zellmaterial aufgenommen haben, sind sie anscheinend nicht mehr zur Entwicklung in Richtung der Fibrocyten und zur Proliferation fähig.

Lymphleukocytenstückchen bestehen vorwiegend aus kleinen und mittleren Lymphocyten. Wenn man annimmt, daß diese Zellen den Ausgangspunkt für die in den Blutleukocytenkulturen beobachteten Proliferationen von Fibrocyten darstellen, so müßte sich dieser Prozeß in den Lymphleukocytenkulturen ganz besonders eindrucklich demonstrieren, da diese Zellen mehr als 4mal häufiger sind. Wir konnten jedoch in keiner Art von Lymphkulturen progressive Veränderungen der kleinen und mittleren Lymphocyten feststellen. Die kleinen und mittleren Lymphocyten können also nicht verantwortlich sein für die fibrocytäre Entwicklung der Blutleukocytenkulturen.

In früheren Züchtungsversuchen mit Lymphe des Ductus thoracicus (BLOOM 1928, 1937, HALL und FURTH 1938, MEDAWAR 1940) oder eines peripheren Lymphgefäßes (MURAKAMI 1936) wurden teilweise andere Beobachtungen gemacht. BLOOM beschreibt eine kontinuierliche Weiterentwicklung der kleinen Lymphocyten in große und schließlich in Fibroblasten. In der Existenz der sog. Übergangsformen, wie er unsere Zwischenformen nennt, sieht er einen Beweis für diese Auffassung. Sein Ausgangsmaterial scheint sehr reich an solchen Übergangsformen gewesen zu sein. Eine Erklärung für die Zusammensetzung der Lymphe in seinen Versuchen kann man in der experimentellen Peritonitis und in seiner Technik für die Lymphsammlung finden. Er schneidet den Ductus thoracicus an und saugt die ausgelaufene Lymphe in der Umgebung des Ductus mit einer Pipette auf. MEDAWAR, die diese Technik in einem Fall wiederholte, fand in der so gewonnenen Lymphe 5% sichere Monocyten unter den 23% großen Mononucleären. Die Zusammensetzung der Lymphe gleicht damit derjenigen des Blutes und es wundert uns nicht, daß BLOOM mit solchem Ausgangsmaterial viele fibroblastenähnliche Zellen beobachtete. Trotzdem hat er in seinen Kulturen anscheinend kein zusammenhängendes Gewebe von proliferierenden Fibrocyten erhalten.

Alle anderen beschreiben nur degenerative Veränderungen in den Kulturen von Lymphe. HALL und FURTH, MEDAWAR, die nur in Objektträgern züchten, geben an, daß die Lymphocyten unter diesen Bedingungen in den ersten 24—48 Std absterben. Wir machten mit Objektträgerkulturen dieselbe Erfahrung und verließen diese Technik zugunsten der Carrel-Flaschen — und Rollertubestechnik. Speziell die Rollertubestechnik ermöglicht günstige Kulturbedingungen für die sehr sauerstoffbedürftigen Lymphocyten (TROWELL 1952). Die Beobachtungen von MURAKAMI und unsere eigenen stimmen im Hinblick auf eine Überlebenszeit der kleinen Lymphocyten *in vitro* von 4—7 Tagen überein.

Wenn wir uns schließlich fragen, ob die *in vitro* erhobenen Befunde auf die Vorgänge im Organismus übertragen werden können, so läßt sich sagen, daß die aus der Lymphe gewonnenen Lymphocyten unverändert ins Blut eingeschwemmt werden. Es ist nicht anzunehmen, daß sie im Blut Veränderungen durchmachen, die im Plasmamedium *in vitro* nicht auch zu beobachten wären. Es ist dagegen möglich, daß die aus dem Blut emigrierten Lymphocyten am Orte der Entzündung noch zu anderen Veränderungen fähig sind.

Unsere Untersuchungen an Gewebekulturen geben aber keine Anhaltspunkte, um den kleinen und mittleren Lymphocyten weitere Entwicklungsfähigkeiten zuzuerkennen, wohl aber den großen Lymphocyten, den Zwischenformen und den Monocyten.

Zusammenfassung

Ausgehend von der Frage nach den Entwicklungspotenzen der verschiedenen Blutleukocyten züchteten wir vergleichsweise Blutleukocyten und Lymphleukocyten des Ductus thoracicus unter gleichen Bedingungen *in vitro*.

Die beiden Filme aus Blut und aus Lymphe enthalten mit Ausnahme der Granulocyten die gleichen Zellen, aber in verschiedenen Anteilen: Der Blutleukocytenfilm setzt sich zusammen aus 66% Granulocyten, 22% kleinen und mittleren Lymphocyten und 12% großen mononucleären Formen; der Lymphleukocytenfilm enthält 96% kleine und mittlere Lymphocyten und 4% große mononucleäre Zellen.

In den Kulturen des Blutleukocytenfilmes bildete sich nach 5 bis 7 Tagen in sehr vielen Fällen ein proliferierendes fibrocytäres Gewebe; in den Kulturen von Lymphe hingegen kam es nur ganz ausnahmsweise zur Bildung eines solchen Gewebes, die meisten Zellen gingen in den Lymphkulturen nach 5—7 Tagen zugrunde, einige wenige Zellen, etwa der Zahl der großen Mononucleären entsprechend, wandelte sich zu Makrophagen und Riesenzellen um.

Auf Grund der vergleichenden Züchtung von Blut- und Lymphzellen ist anzunehmen, daß die kleinen und mittleren Lymphocyten nicht verantwortlich sind für die Bildung des fibrocytären Gewebes; sonst müßte sich dieser Prozeß in den zum größten Teil aus diesen Zellen bestehenden Lymphkulturen ganz besonders eindrucklich demonstrieren. Die großen mononucleären Zellen, Monocyten und große Lymphocyten scheinen den Ausgangspunkt für die beobachtete Umwandlung in Fibrocyten darzustellen.

Literatur

- ALLGÖWER, M.: The cellular basis of wound-healing. Springfield: Charles Thomas 1956. — ASCHOFF, L., u. K. KIYONO: Zur Frage der großen Mononucleären. *Fol. haemat.* (Lpz.) **15**, 383 (1913). — BERGEL, S.: Zur Morphologie und Funktion der Lymphocyten. *Arch. exper. Zellforsch.* **3**, 23 (1927). — Zur Wandlungsfähigkeit der Lymphocyten. *Arch. exper. Zellforsch.* **9**, 269 (1930a). — BERMAN, L.: Observations on dry films of cultures of lymphoid tissue. *Arch. of Path.* **33**, 295 (1942). — BLOOM, W.: Mammalian lymph in tissue culture. From lymphocyte to fibroblast. *Arch. exper. Zellforsch.* **5**, 269 (1927/28). — Transformation of lymphocytes into granulocytes in vitro. *Anat. Rec.* **69**, 99 (1937). — BOLLMAN, J. L., J. C. CAIN and J. H. GRINDLAY: Techniques for collection of lymph from liver, small intestine or thoracic duct of rat. *J. Labor. a. Clin. Med.* **33**, 1349 (1948). — BRUYN, P. P. H. DE: The motion of the migrating cells in tissue culture of lymph nodes. *Anat. Rec.* **93**, 295 (1948). — BUNTING, C. H., and J. HUSTON: The fate of the lymphocyte. *J. of Exper. Med.* **33**, 593 (1921). — CARREL, A., and A. H. EBELING: Pure cultures of large mononuclear leucocytes. *J. of Exper. Med.* **36**, 365 (1922). — The transformation of monocytes into fibroblasts through the action of the Rous virus. *J. of Exper. Med.* **43**, 461 (1926). — DUNNING, H. S., and J. FURTH: Relations between microglia, histiocytes and monocytes. *Amer. J. Path.* **11**, 895 (1935). — EBERT, R. H., and A. G. SANDERS: The extravascular development of the monocyte observed in vitro. *Brit. J. Exper. Path.* **20**, 342 (1939). — EBERT, R. H., A. G. SANDERS and H. W. FLOREY: Observations on lymphocytes in chambers in rabbits ear. *Brit. J. Exper. Med.* **21**, 212 (1940). — EHRLICH, W. E.: Die Leukocyten und ihre Entstehung. VII. Die Leukocyten in der Gewebekultur. *Erg. Path.* **29**, 1 (1934). — ERF, L. A.: The disappearance of intravenously injected lymphocytes in the absence of the gastrointestinal tract. *Amer. J. Med. Sci.* **200**, 1 (1940). — FARR, R. S.: Experiments on the fate of the lymphocyte. *Anat. Rec.* **109**, 515 (1951). — FISCHER, A.: Sur la transformation in vitro des gros mononucléaires en fibroblastes. *C. r. Soc. Biol. Paris* **92**, 109 (1925). — HAAN, J. DE: Das Auftreten der verschiedenen Zelltypen in Blut- und Bindegewebe nach Untersuchungen mittels der Durchströmungskultur in vitro. *Arch. exper. Zellforsch.* **7**, 298 (1928/29). — HALL, J. W., and J. FURTH: Cultural studies on relationship of lymphocytes to monocytes and fibroblasts. *Arch. of Path.* **25**, 46 (1938). — JORDAN, H. E., and C. C. SPEIDEL: The fate of the mammalian lymphocyte. *Anat. Rec.* **26**, 223 (1923). — KINDRED, J. E.: A quantitative study of the hemopoietic organs of the young adult rat. *Amer. J. Anat.* **71**, 207 (1942). — KINDWALL, J. A.: A supra-vital study of the cells in the lymph stream of the rabbit. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **40**, 39 (1927). — KOLOUCH, F.: The lymphocyte in acute inflammation. *Amer. J. Path.* **15**, 413 (1939). — KREYBERG, L.: The prospective potencies of the human lymphocyte. *Arch. exper. Zellforsch.* **8**, 359 (1929). — LATTÄ, J. S., u. H. N. JOHNSON: Studies on lymphatic tissue grown in vitro with splenic extract as culture medium. *Arch. exper. Zellforsch.*

16, 221 (1934). — LEWIS, M. R., and W. H. LEWIS: Transformation of white blood cells into macrophages, epitheloid cells and giant cells. *J. Amer. Med. Assoc.* **84**, 798 (1925). — MARCHAND, F.: Der Prozeß der Wundheilung mit Einschluß der Transplantation. Stuttgart: Ferdinand Enke 1901. — MASUGI, M.: Über die Beziehungen zwischen Monocyten und Histiocyten. *Beitr. path. Anat.* **76**, 396 (1927). — MAXIMOW, A. A.: Experimentelle Untersuchungen zur postfoetalen Histogenese des myeloiden Gewebes. *Beitr. path. Anat.* **41**, 122 (1907). — Cultures of blood leucocytes. From lymphocyte and monocyte to connective tissue. *Arch. exper. Zellforsch.* **5**, 169 (1927/28). — MEDAWAR, J.: Observations on lymphocytes in tissue culture. *Brit. J. Exper. Path.* **21**, 205 (1940). — MÜHLETHALER, J. P.: De la mobilisation des histocytes à l'état de macrophages. *Acta anat. (Basel)* **15**, 289 (1952). — MURAKAMI, J.: Reinkultur von Lymphocyten aus peripherer Gefäßlymphe. *Arch. exper. Zellforsch.* **18**, 266 (1936). — REBUCK, J. W.: On the role of the monocyte in inflammation as demonstrated by a new technique. *Anat. Rec.* **76**, Suppl. 2, 46 (1940). — Functions of neutrophils and lymphocytes in acute inflammation in man. *Anat. Rec.* **103**, 497 (1947). — REEVES, D. L.: A study on the in vivo and in vitro behaviour of the monocytes of the blood stream and connective tissue. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **55**, 245 (1934). — ROUS, P.: Some differential counts of the cells of the lymph of the dog: their bearing in problems of haematology. *J. of Exper. Med.* **10**, 537 (1908). — SANDERS, A. G., H. W. FLOREY and J. M. BARNES: The output of lymphocytes from the thoracic duct in cats and rabbits. *Brit. J. Exper. Path.* **21**, 254 (1940). — SEEMANN, G.: Die Beziehungen zwischen Lymphocyten, Monocyten und Histiocyten insbesondere bei Entzündung. *Beitr. path. Anat.* **85**, 303 (1930). — SHIOMI, C.: Explantationsversuche mit Lymphknoten unter Zusatz von Milz-, Nebennieren- und Knochenmarkextrakt unter Nachprüfung der Versuche von MAXIMOW und unter Berücksichtigung der Bildung granulierter Zellen. *Virchows Arch.* **257**, 714 (1925). — SIERACKI, J. C.: The neutrophilic leucocyte. *Ann. New York Acad. Sci.* **59**, 690 (1955). — SJÖVALL, H.: Regeneration and destruction of lymphocytes in organism. *Nord. med. Tidskr.* **14**, 1272 (1937). — THORNE, G. W., and H. M. EVANS: Absence of monocytes in the thoracic duct. *Anat. Rec.* **23**, 42 (1922). — TROWELL, O. A.: The culture of lymph nodes in vitro. *Exper. Cell. Res.* **3**, 79 (1952). — WEIDENREICH, F.: Zur Morphologie und morphologischen Stellung der ungranulierten Leukocyten — Lymphocyten — des Blutes und der Lymphhe. *Arch. mikrosk. Anat.* **73**, 793 (1909). — YOFFEY, J. M.: The quantitative study of lymphocyte production. *J. of Anat.* **67**, 250 (1932). — The mammalian lymphocyte. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* **25**, 314 (1950).

Frau Dr. LOTTE HULLIGER, Chirurgische Universitätsklinik Basel

